

**3^e séminaire du Réseau
«Biotechnologies du Palmier Dattier»**

18-20 Novembre 2008, Montpellier, France



**Étude et maîtrise des variants somaclonaux
chez le palmier à huile**



*Estelle Jaligot,
Pascal Ilbert & Alain Rival*

CIRAD, Montpellier
19 novembre 2008



Le palmier à huile: intérêt économique

- 1^{ère} source de corps gras végétaux
- Rendement en huile exceptionnel (moy. 7 t / ha)
- Importance stratégique pour les pays du Sud
- Accroissement de la demande



**Intérêt de l' amélioration
génétique
(intensification durable)**



Intérêt d'une approche biotechnologique de l'amélioration

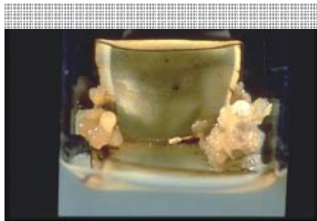
- Amélioration génétique classique: problématique sur pérenne (cycles longs), hétérogénéité (hétérosis, hybrides)
- Récalcitrance à la propagation végétative « classique »



Mise au point d'un protocole de micropropagation *in vitro* des individus d'élite



Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
- Acclimatation
- Pré-pépinière, pépinière puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



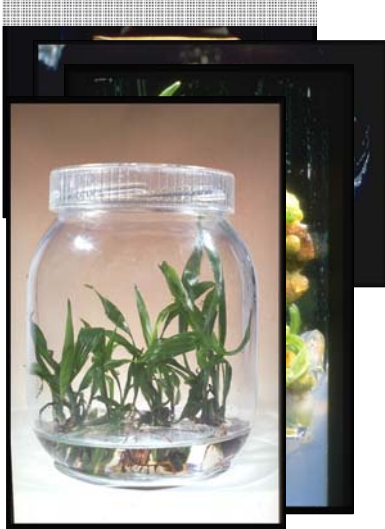
- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
- Acclimatation
- Pré-pépinère, pépinère puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
- Acclimatation
- Pré-pépinère, pépinère puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
 - Enracinement (+ANA)
 - Acclimatation
 - Pré-pépinière, pépinière puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
 - Acclimatation
 - Pré-pépinière, pépinière puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
- Acclimatation
- * Pré-pépinière, pépinière puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique



- Callogenèse sur explants foliaires (+2,4-D)
- Induction de l'embryogenèse (-2,4-D)
- Embryogenèse adventive
- Pousses feuillées
- Enracinement (+ANA)
- Acclimatation
- Pré-pépinière, pépinière puis plantation

Protocole d'embryogenèse somatique

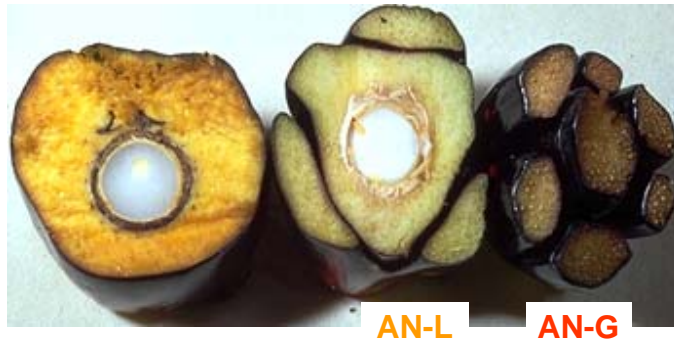


- Production de 3 M de vitroplants
- Transfert vers plantations-pilotes pays producteurs

Problèmes révélés lors du changement d'échelle:
coût élevé des vitroplants, variation somaclonale

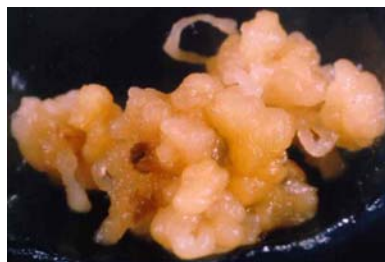


L'anomalie « mantled »: incidence



IDEFOR Côte d'Ivoire	29 415	3.7 %	6.0 %
FELDA Malaisie	18 935	5.6 %	2.4 %
IOPRI Indonésie	6 771	5.3 %	7.4 %

Anomalie « mantled »: impact du processus de micropropagation



Cal Compact Nodulaire (CCN)

5%

**Variants
somaclonaux**



100%

Cal à Croissance Rapide (CCR)

Caractéristiques du phénotype « mantled »

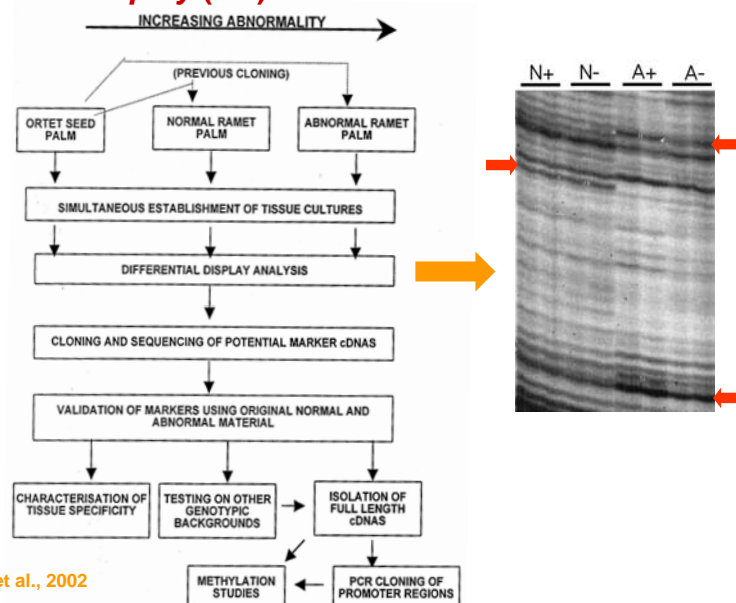
- Obtenue avec tous les protocoles d'embryogenèse somatique connus à ce jour, en % peu variables
- Réversion spontanée au cours du temps
- Transmission non Mendélienne par voie sexuée
- Re-clonage d'un régénérant AN: donne toujours un AN
- Pas de variation du niveau de ploïdie (cytométrie de flux)
- Pas de défaut génétique détectable (RAPD, AFLP)



Hypothèse d'une origine épigénétique, rendue crédible par rôle des hormones (2,4-D), influence stade de développement / CIV, anomalies florales connues

- étude du transcriptome
- étude de la méthylation

Identification de marqueurs d'expression: *differential display (1/2)*



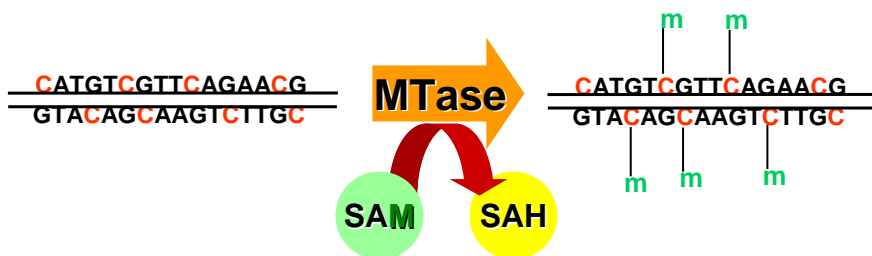
Tregear et al., 2002

Marqueurs d'expression: bilan (2/2)

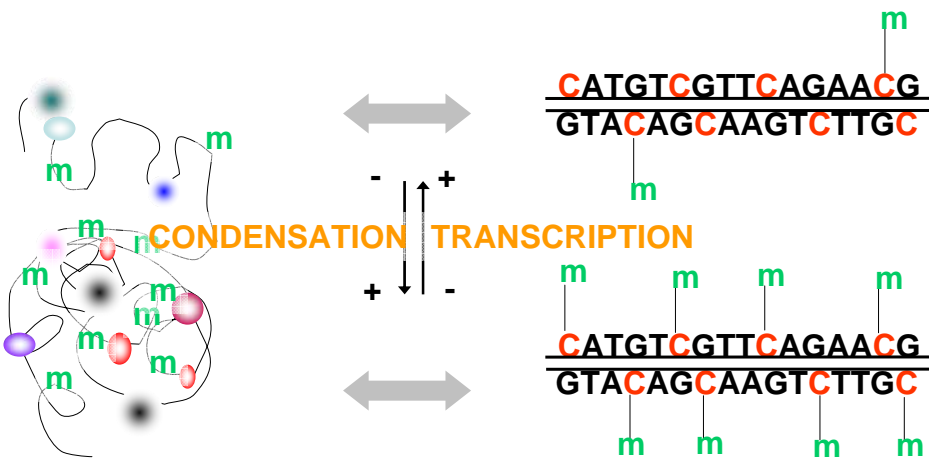
- Identification de marqueurs d'expression phénotype-spécifiques
- Marqueurs spécifiques des différents stades de développement
- **MAIS**
 - i) forte influence du génotype, impossible d'identifier un marqueur "universel"
 - ii) différences d'expression souvent quantitatives entre N et AN
- **DONC** il apparaît comme nécessaire de rechercher des marqueurs en adoptant une approche "gènes-candidats"; caractérisation des régulations au niveau des gènes correspondants

La méthylation de l'ADN

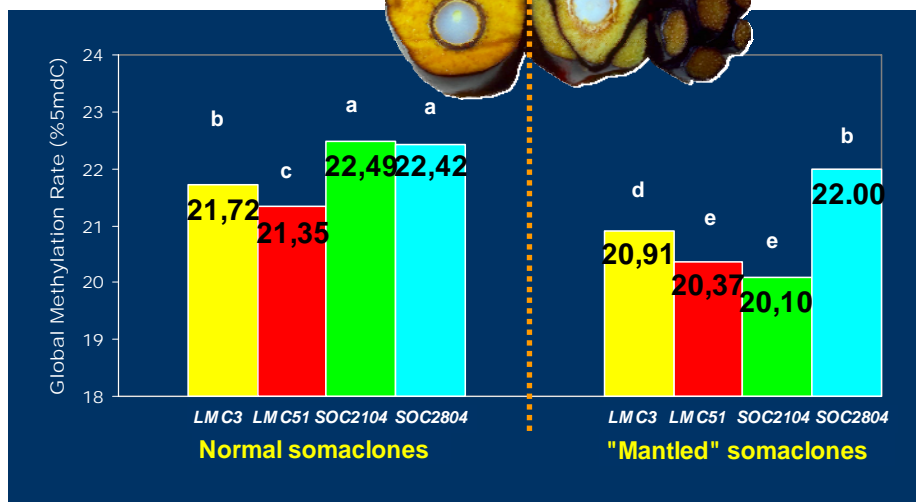
Modification des C de l'ADN, post-répllicative



Méthylation de l'ADN et conformation de la chromatine

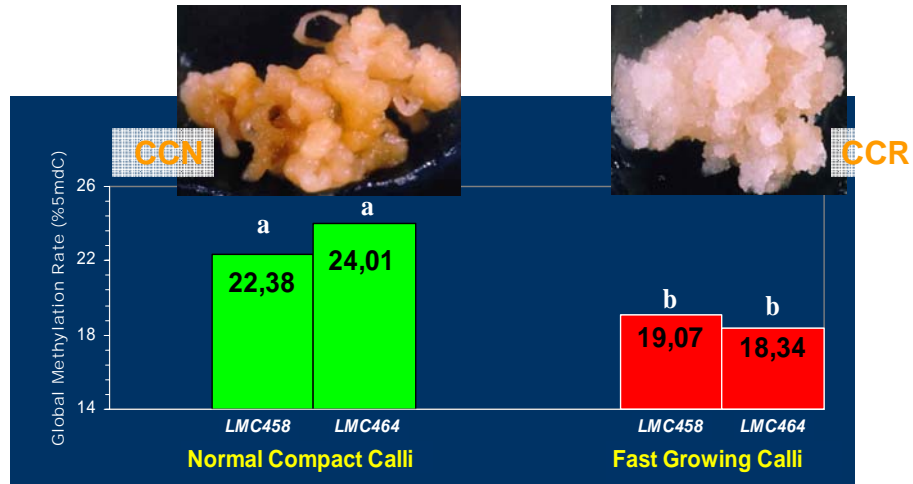


HPLC (1/2)

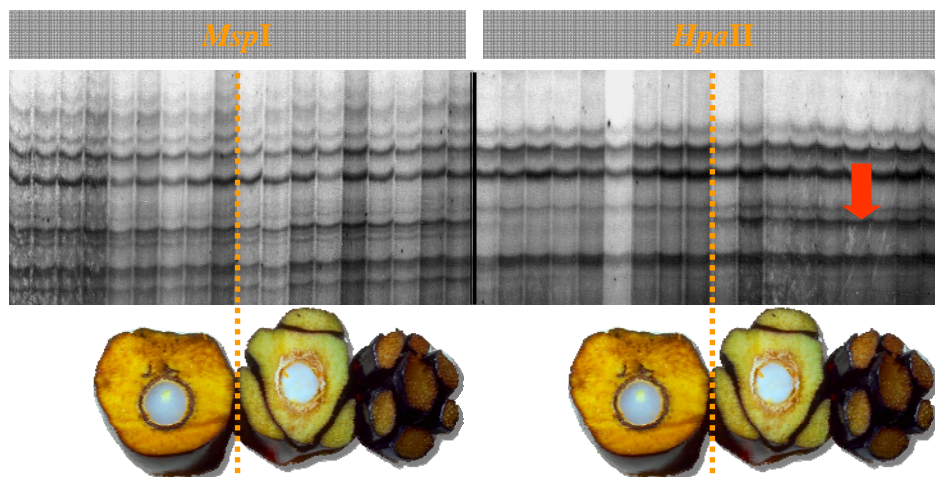


Jaligot et al., 2000

HPLC (2/2)



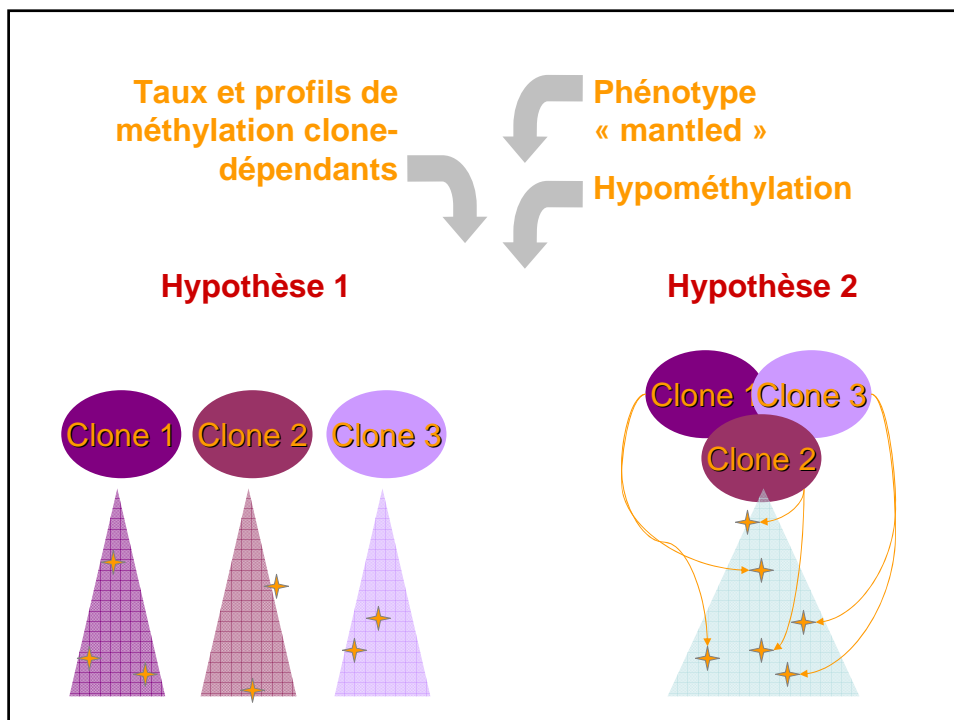
Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)



Jaligot et al., 2004

Profils de méthylation: bilan

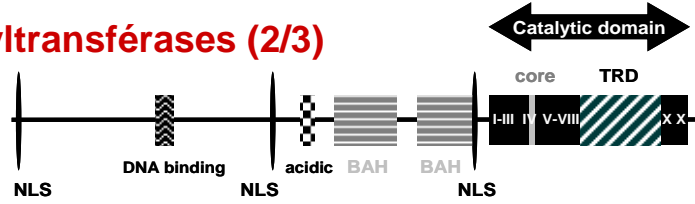
- Nombreux changements de méthylation associés au phénotype anormal
- **MAIS**
 - i) forte influence du génotype, impossible d'identifier un marqueur "universel"
 - ii) l'identité des marqueurs isolés ne désigne pas une voie de régulation en particulier comme étant commune à tous les anormaux
- **DONC** il apparaît comme nécessaire de rechercher des marqueurs en adoptant une approche "gènes-candidats"



ADN-méthyltransférases (2/3)

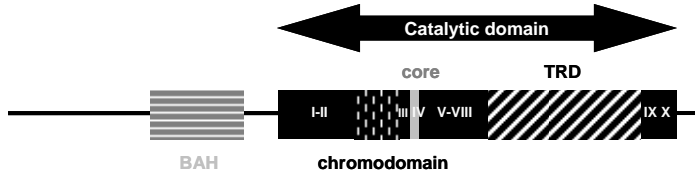
EgMET1

id. 65% riz,
67% maïs



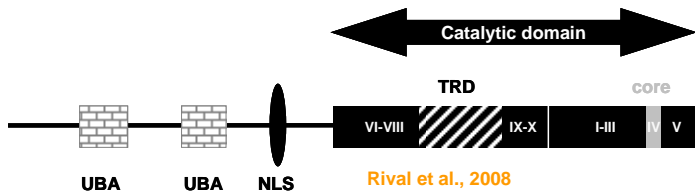
EgCMT1

id. 64% maïs,
62% riz, orge



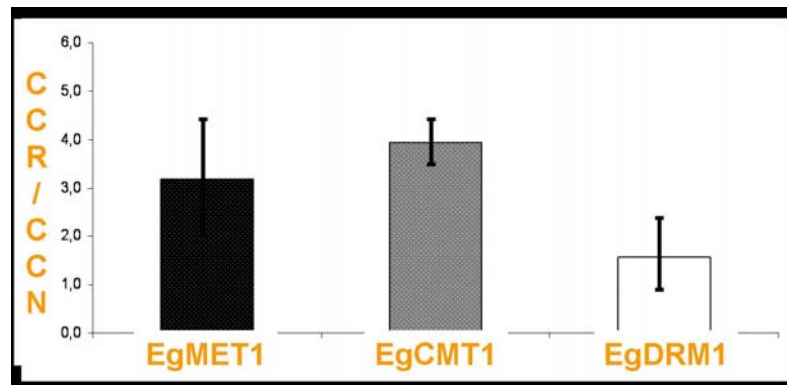
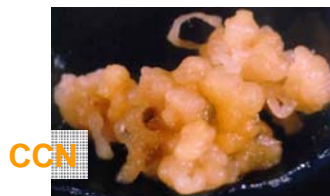
EgDRM1

id. 68% orge,
59% tabac



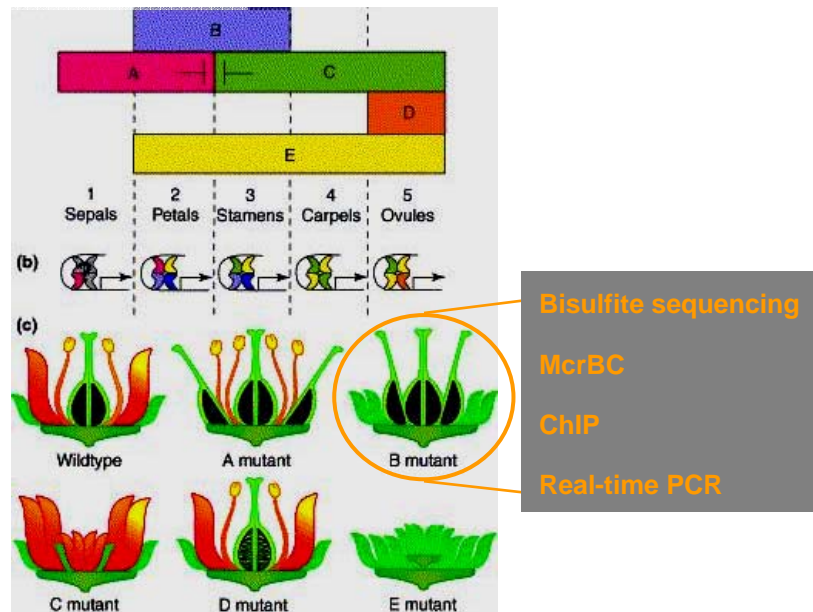
Rival et al., 2008

ADN-méthyltransférases (3/3)



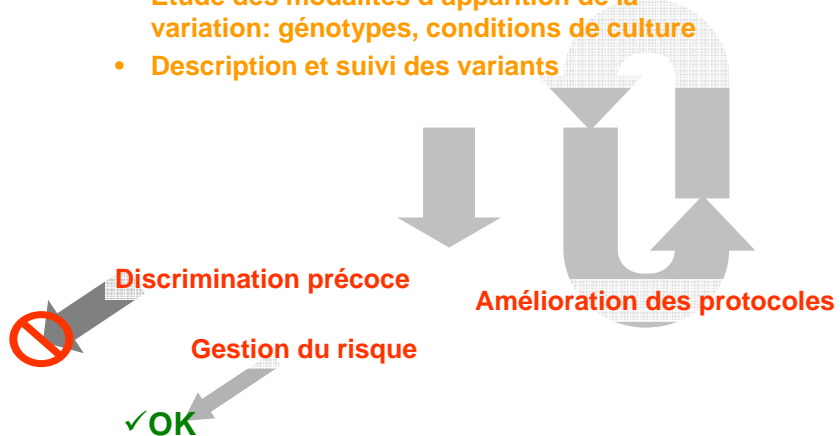
Rival et al., 2008

Gènes MADS-box



Gérer le risque en exploitation commerciale (1/2)

- Étude des modalités d'apparition de la variation: génotypes, conditions de culture
- Description et suivi des variants



Gérer le risque en exploitation commerciale (2/2)

- L'apparition des variants en micropropagation est fonction de :
 - La quantité et la qualité des hormones utilisées
 - Le temps de culture
 - Le génotype utilisé
- Stratégies de gestion du risque d'apparition de variants
 - Limiter le temps de culture (projet ANR Vitropalm)
 - Limiter le nombre de vitroplants par culture
 - Développement de protocoles hormone-free
 - Panachage des génotypes

Des stratégies d'évitement efficaces?

Aujourd'hui, plusieurs laboratoires industriels fonctionnent avec des objectifs de production de l'ordre de 1 M vitroplants / an:

- L'apparition de variants est maîtrisée (<2%), en l'absence de marqueurs moléculaires
- Le coût du vitroplant a baissé, grâce au développement des suspensions embryogènes à grande échelle

Des stratégies d'évitement efficaces?

Risque sur la qualité génétique du matériel:

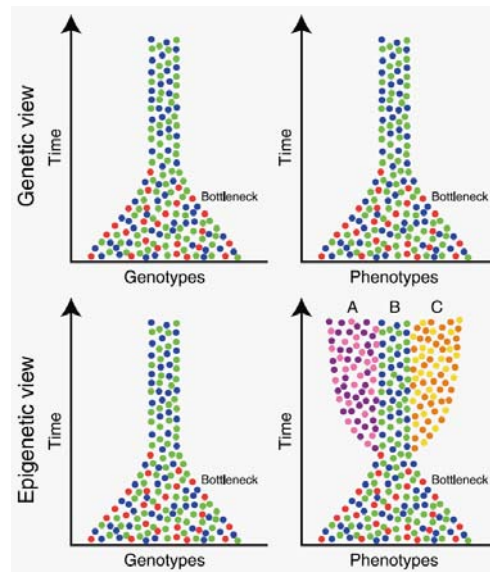
- Multiplication des opérations de clonage donc sélectivité moindre sur les têtes de clones
- Individus d'élite sélectionnés sur rendement individuel, faute d'essais génétiques à grande échelle



Le risque est donc de produire des plants pas forcément plus performants que la moyenne du croisement dont ils sont issus...

Des questions demeurent...

- La variation « mantled » n'est détectable que chez la plante adulte => comment appliquer des marqueurs aux stades précoces de la micropropagation?
- Si l'on veut gérer le potentiel de variation épigénétique (sélection) => quelles sont les règles de l'expression et de la transmission épigénétiques?



Rapp and Wendel, 2005